

RO/KR 23. 08. 2004



This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2003-0054204
Application Number

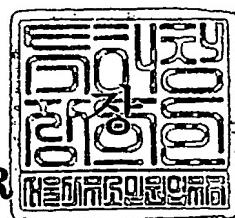
출원년월일 : 2003년 08월 05일
Date of Application AUG 05, 2003

출원인 : 김철민 외 2명
Applicant(s) KIM, CHEOL-MIN, et al.

2004년 08월 04일

특허청

COMMISSIONER



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0003
【제출일자】	2003.08.05
【국제특허분류】	C12N
【발명의 명칭】	품질 관리 프로브 및 음성 조절 프로브를 함유하는 약제 내성 B형 간염 바이러스 검출용 마이크로어레이 및 이를 이용한 약제 내성 B형 간염 바이러스의 검출 방법
【발명의 영문명칭】	Microarray comprising probes for drug-resistant hepatitis B virus detection, quality control and negative control, and Method for detecting drug-resistant hepatitis B virus using the same
【출원인】	
【성명】	김철민
【출원인코드】	4-1999-034184-5
【출원인】	
【성명】	박희경
【출원인코드】	4-1999-034186-8
【출원인】	
【성명】	조봉
【출원인코드】	4-2003-029750-7
【대리인】	
【성명】	이영필
【대리인코드】	9-1998-000334-6
【대리인】	
【성명】	이해영
【대리인코드】	9-1999-000227-4
【발명자】	
【성명】	김철민
【출원인코드】	4-1999-034184-5
【발명자】	
【성명】	박희경
【출원인코드】	4-1999-034186-8

【발명자】

【성명의 국문표기】 장현정
 【성명의 영문표기】 JANG,Hyun Jung
 【주민등록번호】 730415-2114238
 【우편번호】 608-043
 【주소】 부산광역시 남구 문현3동 395번지 삼성아파트 105동 1402호
 【국적】 KR

【발명자】

【성명】 조옹
 【출원인코드】 4-2003-029750-7

【발명자】

【성명의 국문표기】 허정
 【성명의 영문표기】 HE0,Jeong
 【주민등록번호】 690209-1090619
 【우편번호】 600-074
 【주소】 부산광역시 중구 부평동 4-20 22동 4반
 【국적】 KR

【심사청구】 청구

【핵산영기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 83
 【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
 이영필 (인) 대리인
 이해영 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 52 면 52,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 18 항 685,000 원

【합계】 766,000 원

【감면사유】 개인 (70%감면)

【감면후 수수료】 229,800 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2.위임장_3통



1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

【요약서】

【요약】

본 발명은 약제 내성 B형 간염 바이러스(HBV)를 검출하기 위한 표적 프로브(target probes)와 마이크로어레이의 제작 과정과 혼성화 반응 과정의 품질 관리를 위한 QC 프로브(QC probes), 그리고 한 가지 이상의 야생형과 돌연변이 유형의 혼합 여부 및 정도의 결정, 비특이적 교차 혼성화 반응에 의한 배경 측정, 또는 동형 접합체(homozygote)와 이형 접합체(heterozygote)의 구별을 위한 음성 조절 프로브(negative control probes)를 혼합하여 제작한 마이크로어레이와 이를 이용한 약제 내성 HBV 바이러스의 검출, 마이크로어레이의 품질 관리와 한 가지 이상 유형의 혼합 여부 및 정도의 결정과 각 프로브에 대한 양성과 위양성 결정을 동시에 수행하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 마이크로어레이에는 약제 내성 B형 간염 바이러스 검출용 표적 프로브와 QC 프로브 및 음성 조절 프로브를 포함하고 있어서 약제 내성 B형 간염 바이러스 검출, 마이크로어레이의 제작 과정과 혼성화 반응 과정의 품질 관리와 한 가지 이상의 야생형과 돌연변이 유형의 혼합 여부 및 정도, 비특이적 교차 혼성화 반응에 의한 배경 측정에 의한 각 프로브에 대한 양성과 위양성 결정, 또는 동형 접합체(homozygote)와 이형 접합체(heterozygote)의 구별이 가능할 뿐만 아니라, 이들을 한 세트로 하여 하나의 지지체 위에 다수의 세트로 부착하여 단 1회의 실험으로 다수의 검체로부터 동시에 복수의 약제 내성 B형 간염 바이러스 검출, 품질 관리와 야생형과 돌연변이의 혼합 여부 및 혼합 정도와 각 프로브에 대한 양성과 위양성의 결정이 신속하고 정확하게 진단 및 측정이 가능하다.

【대표도】

도 1a

【명세서】

【발명의 명칭】

품질 관리 프로브 및 음성 조절 프로브를 함유하는 약제 내성 B형 간염 바이러스 검출용
마이크로어레이 및 이를 이용한 약제 내성 B형 간염 바이러스의 검출 방법{Microarray
comprising probes for drug-resistant hepatitis B virus detection, quality control and
negative control, and Method for detecting drug-resistant hepatitis B virus using the
same}

【도면의 간단한 설명】

도 1a에서 a)는 약제 내성 비형 간염 바이러스의 검출을 위한 표적(target) 프로브와 품
질 관리를 위한 QC 프로브를 함유한 각각의 스팟을 한세트로 하여 하나의 지지체에 다수 세트
로 구성하고 있는 마이크로어레이의 도면이다. b)는 a)중 한 세트의 프로브로 구성하고 있는
마이크로어레이의 도면이고, c)는 b) 의 마이크로어레이의 프로브를 유형별 표기한 도면이다.

도 1b에서 a)는 약제 내성 비형 간염 바이러스의 검출을 위한 표적 프로브와 품질 관리
를 위한 QC 프로브 및 한 가지 이상의 유형에 대한 혼합 여부 및 정도와 비특이적 교차 혼성화
반응에 의한 배경 측정을 위한 음성 조절(negative contro) 프로브를 함유한 각각의 스팟을
한 세트로 하여 하나의 지지체에 다수 세트로 구성하고 있는 마이크로어레이의 도면이다. b)는
a)중 한 세트의 프로브로 구성하고 있는 마이크로어레이의 도면이고, c)는 b) 의 마이크로어레
이의 프로브를 유형별 표기한 도면이다.

도 2는 프로브의 고정화 및 혼성화 반응에 대한 검증에 이용되는 QC 프로브의 디자인
다.

도 3a 내지 3c는 도 1a에서 QC 프로브와 표적 프로브를 일정 비율로 혼합하여 슬라이드에 고정시킨 후 슬라이드를 세척 전에 스캐너로 분석한 결과이다.

도 3d 내지 3e는 도 1b에서 QC 프로브, 표적 프로브와 음성 조절 프로브를 일정 비율로 혼합하여 슬라이드에 고정시킨 후 슬라이드를 세척 전에 스캐너로 분석한 결과이다. 도 4는 QC 프로브를 사용하지 않고 약제 내성 B형 간염 바이러스 검출용 표적 프로브만을 슬라이드에 고정시킨 후, 슬라이드를 세척하기 전에 스캐너로 분석한 결과이다.

도 5는 B형 간염 바이러스의 약제 내성 검출을 위한 프로브의 특이적 혼성화 반응의 결과로서, a)는 감수성 B형 간염 바이러스에 대한 것이고, b)는 코돈 552의 YVDD 돌연변이에 의한 내성 B형 간염 바이러스 결과, c)는 코돈 552의 YIDD3에 의한 내성 B형 간염 바이러스 결과이다.

도 6은 두가지 이상의 유형이 혼합된 경우의 혼성화 반응 결과로서, a)는 코돈 552의 야생형(YMDD)과 돌연변이 YVDD가 혼합된 경우의 검출 결과이고, b)는 코돈 528과 코돈 552에 돌연변이(528MM과 YVDD)가 검출된 결과이고, c)는 코돈 528(528MM), 코돈 552의 YVDD와 YIDD3의 3가지 돌연변이가 혼합된 경우의 검출 결과이다.

도 7은 도 6c에 대해 염기서열분석법과 비교 실험 결과로서, a) 내지 b)는 염기서열분석법에 의한 결과이고, c)는 본 발명에 의한 마이크로어레이 분석 결과이다.

도 8은 음성 조절 negative control 프로브에 의한 비특이적 교차 혼성화 반응의 배경을 측정한 결과로서, 8a와 8b는 도 1b에 대한 실제 마이크로어레이의 스캐닝 결과이고, 8c와 8d는 약제 내성 HBV 검출을 위한 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응의 결과이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <10> 본 발명은 약제 내성 B형 간염 바이러스(hepatitis B virus; HBV, 이하 'HBV'라 표기함) 검출용 마이크로어레이에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 지지체에 부착된 약제 내성 HBV 검출 용 표적 프로브, 마이크로어레이 제작(fabrication)과 혼성화 반응 과정의 품질 관리를 위한 QC 프로브, 및 한 가지 이상의 야생형과 돌연변이 유형의 혼합 여부 및 혼합 정도와 비특이적 교차 혼성화 반응(cross hybridization)의 배경(background) 측정을 통한 각 프로브에 대한 양 성과 위양성 결정을 위한 음성 조절(negative control) 프로브를 포함하는 마이크로어레이와 이를 이용한 검출 방법 및 진단 키트에 관한 것이다.
- <11> HBV는 우리나라 성인의 5~6%가 감염되어 있으며, 전 세계 인구의 약 5% 즉, 약 3억 5천 만명 정도가 감염되어 있을 것으로 추정된다(Chutima Pramoolsinsup. J Gastroenterol Hepatol, 17: S125-S145(2002)). B형 간염의 궁극적인 치료는 간 손상으로 인한 간경변으로 이행이나 간암으로 되지 않도록 HBV의 증식을 억제하는 것이다.
- <12> 만성 B형 간염 치료를 위해 면역 조절제와 항바이러스 제재 등의 많은 연구가 이루어지고 있다. 1980년대에 만성 B형 간염의 치료에 인터페론(interferon)을 사용하였으나 고비용에 비경구적 투여, 내성, 부작용과 치료 후 재발 등의 문제점을 드러냈다. 이러한 문제점을 보완 할 수 있으면서 효과적이며 안전하게 치료할 수 있는 라미부딘(lamivudine, 3-TG)이 B형 간염 치료제로 효과가 인정되었다(황성규. 대한간학회지, 8: 93-100(2002)).

<13> 뉴클레오사이드(nucleoside) 유사체인 라미부딘 ((-)-β

-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine)이 HBV의 증식을 억제하는 작용기전은 크게 두 가지로 구분된다. 첫째, 라미부딘은 HBV 디엔에이 중합효소(DNA polymerase)가 지닌 DNA-dependent polymerase의 활성 뿐만 아니라 RNA-dependent polymerase(reverse transcriptase, 역전사 효소)의 활성도 억제한다. 즉, HBV가 복제하는 과정 중 pregenomic RNA에서 마이너스 가닥((-) strand) DNA를 복제하는 역전사 효소와 마이너스 가닥 DNA가 플러스 가닥((+) strand) DNA를 합성할 때 관여하는 디엔에이 중합효소를 저해하여 HBV 증식을 억제한다. 둘째, 라미부딘은 연쇄 종결자(chain terminator)로 작용하여 HBV DNA가 성숙(elongation)하지 못하도록 억제한다. 이 두 가지 기전이 복합적으로 작용하여 HBV의 증식이 억제된다.

<14> 라미부딘을 투여하는 기간이 길면 길수록 HBV DNA의 음전율, ALT(Alanine aminotransferase)의 정상화 그리고 HBeAg의 혈청 전환율이 증가하는 것으로 보고되었다. 또한 우리나라에 10~15% 정도 존재할 것으로 예측되는 HBeAg 음성, anti-HBe는 양성이며 HBV DNA의 혈중 농도가 높은 프리-코어 돌연변이(pre-core mutant)의 경우에도 라미부딘을 장기적으로 투여한 결과 생화학적 개선 효과나 바이러스학적 개선 효과가 높은 것으로 보고되고 있다. 그러나, 투약 종료 후 12개월 및 24개월 누적 재발율이 각각 37.5%와 49.2%로 높다(Song BC, Suh DJ, Lee HC, Chung YH, and Lee YS. Hepatology, 32: 803-806, 2000). 따라서, 일단 투여를 시작하면 보통 1년 이상 장기간 사용해야 한다. 라미부딘의 장기간 사용으로 인해 만성 B형 간염 환자에게 HBV는 돌연변이(mutation)를 일으켜 라미부딘에 대한 저항성을 갖게 되어 라미부딘에 의해 억제되지 않고 계속해서 증식하게 된다. 또한, 다른 뉴클레오티드 유사체인 팜시클로비어(famciclovir)를 장기간 사용하는 경우에도 팜시클로비어 내성 바이러스가 계속해서 증식하게 된다.



1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

<15> 최근, 새로운 뉴클레오티드 유사체 항바이러스제인 아데포비어(adefovir)가 라미부딘과 팜시클로비어를 장기간 사용할 때 출현하는 내성 바이러스에 효과적인 것으로 밝혀져 이러한 약제에 대한 내성 바이러스 문제에 대한 해결책으로 보고되고 있다(황성규. 대한간학회지. 1: 93-100, 2002). 따라서, 만성 B형 간염 환자에서 HBV의 약제 내성을 조기에 진단하는 것은 여러 가지 약제의 병합 치료 여부의 결정 등 환자 개개인의 치료에 있어 매우 중요하다. 이러한 약제 내성 HBV의 효과적인 치료를 위해서 조기 진단 방법과 약제 내성 여부를 민감하고 신속하게 결정하기 위한 방법의 개발 필요성이 요구되고 있다.

<16> 현재 이용되고 있는 HBV 검사는 단지 HBV DNA 진단 검사만이 이루어지는 한계점을 가진 것으로 효소면역측정법(EIA)과 방사선면역측정법(RIA)은 HBV DNA 진단을 위한 방법으로 자동화 기기를 이용하여 비교적 간편하지만 민감도가 낮고 내성 진단을 위한 변이형 HBV의 진단이 어려운 한계를 가진다. 또한, PCR 방법은 민감도는 높으나 점돌연변이(point mutation)에 의한 변이형 HBV의 검출에 한계를 가진다.

<17> 항바이러스 치료에 대한 바이러스의 내성은 치료 동안 혈청에서 바이러스 DNA 레벨 증가(즉, 표현형적 내성, phenotypic resistance)와 치료전에 주요 바이러스의 종에서 검출할 수 없고 데이터 은행(data bank)으로부터 파생된 염기서열과 일치하지 않은 바이러스의 중합효소 유전자에서의 돌연변이 선택(즉, 유전형적 내성, genotypic resistance)에 의해 일반적으로 결정된다. 그러나, 표현형적 내성의 보다 자세한 정의는 *in vitro*에서의 조직 배양을 필요로 하는데, 특히 새로운 돌연변이를 동정할 때 조직 배양을 필요로 한다는 문제점을 가지고 있다. 유전형적 내성 정의를 위해 현재 바이러스 내성의 임상적 정의 즉, 검출 및 진단을 위한 기준으로 1996년에 Ling 등에 의한 PCR 산물의 직접적인 염기서열 분석법(Direct sequencing of PCR products), 1998년 Chayama 등과 1999년 Allen 등에 의한 PCR 산물의 제한효소절편길이다양성



1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

분석법(RFLP analysis of PCR products), 2000년 Stuyver 등에 의한 라인프로브 분석법(Line Probe assay) 그리고 2000년 Seigners 및 Stuyver 등에 의한 클론 분석법(Clonal analysis) 등의 바이러스의 중합효소 유전자의 염기서열 분석법이 연구되어 유전형적 내성 분석법으로 이용되고 있다. 그러나, 아직까지 단일염기서열의 차이를 구별할 수 있으며 한번의 실험으로 다양한 돌연변이를 검출할 수 있는 디엔에이칩(DNA chip, oligonucleotide chip)을 이용한 바이러스의 내성 분석법은 발표되지 않고 있다(Fabien Zoulim. J Clin Virol., 21: 243-253, 2001). .

<18> 바이오칩(biochip)은 유리, 실리콘, 혹은 나일론 등의 재질로 된 작은 기판 위에 디엔에디(DNA), 단백질 등의 생체분자(biomolecule)들을 고정화시켜 놓은 것을 말하며 이때 디엔에이를 고정화시켜 놓은 것을 디엔에이칩(DNA chip), 단백질을 고정화시켜 놓은 것을 단백질칩(protein chip)이라 명명한다. 또한 바이오칩은 마이크로어레이칩(microarray chip)과 마이크로플루이딕스칩(micro fluidics chip)으로 크게 나눌 수 있다. 마이크로어레이칩은 수천 또는 수 만개 이상의 디엔에이나 단백질 등을 일정 간격으로 배열하여 부착시키고, 분석 대상 물질을 처리하여 그 결합양상을 분석할 수 있는 바이오칩으로 디엔에이칩, 단백질칩 등이 대표적이다. 마이크로플루이딕스칩은 랩온어칩(Lab-on-a-chip)이라고도 하는데 미량의 분석 대상물질을 주입하여 칩에 고정화되어 있는 각종 생물분자 프로브 혹은 센서와 반응하는 양상을 분석할 수 있는 바이오칩이다. 디엔에이칩은 고정화시키는 프로브의 종류에 따라 올리고뉴클레오티드칩(oligonucleotide chip), cDNA chip과 PNA chip 등으로 구분할 수 있다. 올리고뉴클레오티드칩 기술은 대규모의 유전적 다양성을 조사할 수 있는 새로운 방법으로서 지지체의 아주 작은 공간의 정확한 위치에 다수의 합성 올리고뉴클레오티드를 부착시켜 아주 적은 양의 표적 염기서열과 혼성화 반응을 함으로서 동시에 많은 유전자를 검색할 수 있게 되었다. 이러한 올리고뉴클레오티드칩은 약제 내성 검색 진단, 돌연변이 검색, 단일염기다형성(single nucleotide

polymorphism, SNP), 질병 진단 또는 유전자형 확정(genotyping)에 많은 기여를 할 것으로 기대된다.

<19> 바이오칩은 스팟터(spotter)를 이용하여 표적 프로브(target probe)를 지지체에 집적시키는 과정, 표적 산물과 표적 프로브의 혼성화 반응 과정 및 스캐너를 통한 분석 과정을 거치게 된다. 바이오칩 제작시 이러한 과정을 거치는 많은 마이크로어레이 요소들(elements)의 품질관리(quality control; 이하, 'QC'라 표기함)는 마이크로어레이 제작에 매우 중요하며 그 중에서 프로브의 고정화가 바이오칩의 품질을 결정짓는 주요한 요인이다. 따라서, 마이크로어레이를 이용한 실험 및 진단에서 신뢰도 높은 결과를 얻기 위해서는 혼성화 반응 전에 마이크로어레이의 품질 특히 프로브의 고정화 여부를 확인할 필요성이 있다. 또한, 마이크로어레이 제작(fabrication)과 혼성화 반응 과정의 품질 관리를 위해 지지체 위에 표적 프로브와 참고 올리고뉴클레오티드 QC 프로브(reference oligonucleotide QC probe)를 함유하는 프로브를 함께 고정화하여 각각의 마이크로어레이에 대한 정확한 품질 관리가 가능하다.

<20> 또한, 약제 내성 HBV와 같이 야생형 또는 돌연변이 단독으로 존재하거나 야생형과 돌연변이가 혼합된 경우 및 서로 다른 유형의 돌연변이들 간의 혼합된 경우가 존재한다. 이러한 경우, 한 가지 유형 이상의 표적 프로브 염기서열을 함유하는 경우와 함유하지 않는 경우의 구별과 혼합 정도를 구별하기가 매우 어렵다.

<21> 따라서, 더욱 정확한 진단을 위하여 한 가지 이상의 유형에 대한 혼합 여부와 혼합 정도의 결정과 비특이적 교차 혼성화 반응에 의한 배경 측정으로 각 프로브에 대한 양성(positive)과 위양성(false positive) 결과를 구별할 필요성이 있

다. 이러한 혼합 여부 및 혼합 정도와 양성과 위양성 결정을 위해 표적 프로브에는 존재하지 않는 염기서열을 이용한 인위적으로 변형시킨 음성 조절 프로브(negative control probe)를 이용함으로서 검체의 표적 산물 염기서열과 일치하는 프로브 외의 불일치 프로브와 표적 산물과의 비특이적 결합에 의한 교차 혼성화 반응의 배경을 측정함으로서 서로 다른 유형의 혼합 여부 및 혼합 정도와 각 프로브에 대한 양성과 위양성 결정이 가능하다.

<22> 이에 본 발명자들은, 라미부딘 및 팜시클로비어 약제에 대한 내성을 검출하기 위해 각각에 대하여 특이적으로 결합 반응할 수 있는 표적 프로브를 모두 포함하고 있는 올리고뉴클레오티드칩을 개발함으로써, 현재 HBV 검사를 위해 실시하고 있는 혈청학적인 방법을 대체하여 간염 바이러스의 존재 유무에 의한 진단 뿐만 아니라 염기서열 치환 등에 의해 발생하는 바이러스의 약제 내성 변이형 감별에 대비한 신속하고 정확한 진단 및 검출이 가능함을 발견하게 되었으며, 또한, 기존의 마이크로어레이가 가지고 있는 품질 관리에 있어서의 여러 가지 단점과 비효율성을 개선하기 위하여 표적 프로브 즉, 약제 내성 HBV 검출용 프로브와 형광이 표지된 QC 프로브를 혼합하고, 한 가지 이상의 서로 다른 유형의 혼합 여부 및 혼합 정도, 비특이적 교차 혼성화 반응의 배경 측정에 의한 각 프로브에 대한 양성과 위양성 결정, 또는 동형 접합체(homozygote)와 이형 접합체(heterozygote)의 구별이 가능한 프로브 즉, 표적 프로브의 인위적인 변형에 의한 negative control 프로브와 QC 프로브를 혼합하여 마이크로어레이의 각 위치에 부착한 후 혼성화 반응 전에 스캐너로 슬라이드에 스팟팅된 각 프로브에 대하여 품질 확인 후 본 실험에 사용하여 약제 내성 HBV 검출, 한 가지 이상의 야생형과 돌연변이 유형의 혼합 여부 및 정도와 각 프로브에 대한 양성과 위양성 결정, 또는 동형 접합체(homozygote)와 이형 접합체(heterozygote)의 구별, 및 진단용 마이크로어레이에 적용하여 경제적이고 신속, 정확한 마이크로어레이 제작에 관련된 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <23> 따라서, 본 발명의 목적은 HBV의 약제 내성을 대한 신속하고 정확한 진단을 가능하게 하는 마이크로어레이를 제공하는 데 있다.
- <24> 본 발명의 또 다른 목적은 형광표지된 QC 프로브를 함유하여 한번의 실험으로 약제 내성 HBV의 검출 및 진단뿐만 아니라 마이크로어레이의 프로브 고정화와 혼성화 반응 과정의 품질 검사가 용이한 마이크로어레이를 제공하는데 있다.
- <25> 또 다른 본 발명의 목적은 음성 조절(negative control) 프로브를 제공하여 한 가지 이상의 야생형과 돌연변이 유형에 대한 혼합 여부, 정도 결정, 표적 산물과의 비특이적 교차 혼성화 반응에 의한 배경을 측정하여 표적 산물의 염기서열에 일치하는 양성 프로브와 일치하지 않는 위양성 프로브 결정, HBV 뿐만아니라 동형 접합체(homozygote)와 이형 접합체(heterozygote) 등의 양상의 결정, 및/또는 유전자형 확정(genotyping)을 가능하게 하는 마이크로어레이를 제공하는 데 있다.
- <26> 또 다른 본 발명의 목적은 본 발명의 마이크로어레이를 이용하여 복수의 약제 내성 HBV를 동시에 검출하고 경제적이고 신속·정확한 마이크로어레이의 품질 관리 방법을 제공하는데 있다.

【발명의 구성 및 작용】

- <27> 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 지지체에 부착된 B형 간염 바이러스(HBV)의 약제 내성을 검출하기 위한 표적 프로브(probes)를 포함하는 마이크로어레이를 제공한다.

- <28> 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 지지체는 마이크로어레이의 제작에 통상적으로 사용되는 슬라이드글라스, 멤브레인, 반도체 칩(semiconductive chip), 실리콘 또는 젤(gel) 등을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.
- <29> 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 표적 프로브는 마이크로어레이의 종류에 따라 B형 간염 바이러스를 검출할 수 있는 어떤 바이오 물질도 포함할 수 있으나, 바람직하게는 cDNA, 올리고뉴클레오티드, PNA(peptide nucleic acid), LNA (locked nucleic acid)와 HNA(hexitol nucleic acid) 등의 DNA 유사체(analogues), 펩타이드 또는 단백질인 것을 특징으로 한다.
- <30> 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 약제 내성 HBV를 검출하기 위한 표적 프로브는 라미부딘(lamivudine) 및/또는 팜시클로비어(famciclovir)에 대한 내성을 유도하는 표적 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드, 바람직하게는 라미부딘 내성을 유도하는 HBV DNA polymerase 유전자의 B 영역의 코돈 528, 529와 514 부위와 C 영역의 코돈 552, 548과 555 부위의 점돌연변이 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드, 및/또는 팜시클로비어 내성을 유도하는 HBV DNA polymerase 유전자의 B 영역의 코돈 528, 529 부위와 C 영역의 코돈 555 부위의 점돌연변이 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 서열번호 7 내지 47의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <31> 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 바람직하게는 한가지 이상의 다른 유형의 혼합여부와 정도의 검출, 비특이적 교차 혼성화 반응의 배경 측정에 의한 양성과 위양성 프로브의 검출, 동형 접합체(homozygote)와 이형 접합체(heterozygote)의 구별, 및/또는 유전자형 확정(genotyping)을 위한 음성 조절 (negative control) 프로브를 더 포함하는 것을 특징으로 한다

<32> 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 음성 조절 (negative control) 프로브는 바람직하게는 표적 프로브의 염기서열 중 하나 이상의 염기서열을 치환, 삽입 또는 결실 등의 방법에 의해 인위적으로 변형시켜 표적 산물과 혼성화되지 않도록 고안된 것을 특징으로 하며, 더욱 바람직하게는 서열번호 48 내지 83의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 한다.

<33> 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 바람직하게는 표적 산물에 표지된 형광물질과 다른 여기/방출(excitation/emission) 파장을 가지는 형광물질로 표지된 QC 프로브와 표적 프로브를 하나의 스팟에 함께 함유하는 것을 특징으로 한다.

<34> 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, QC 프로브는 바람직하게는 표적 프로브와 동일하거나 임의의 염기서열을 가지며 염기서열의 하나 또는 그 이상의 자리에 형광물질로 표지된 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 한다.

<35> 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, QC 프로브에 표지된 형광물질은 피레닌(Pyrene), 싸이아닌 2 (Cyanine 2), GFP, 칼세인(Calcein), FITC, 알렉사(Alexa 488), FAM, 플로레센 클로로트리아지닐(Fluorescein Chlorotriazinyl), 플로레센(Fluorescein), 로다민(Rhodamine 110), 오레건 그린(Oregon Green), 마그네슘 그린(Magnesium Green), 칼슘 그린(Calcium Green), JOE, 싸이아닌 3(Cyanine 3), 테트라메틸로다민(Tetramethylrhodamine), TRITC, TAMRA, 로다민 팔로이딘(Rhodamine Phalloidin), 피로닌 Y(Pyronin Y), 리싸민(Lissamine), ROX, 칼슘크림선(Calcium Crimson), 텍사스 레드(Texas Red), 나일 레드(Nile Red), 싸이아닌 5(Cyanine 5), 및 티아디카복시아닌(Thiadicarbocyanine)으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 물질인 것을 특징으로 한다.

- <36> 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 바람직하게는 한가지 이상의 다른 유형의 혼합여부와 정도의 검출, 비특이적 교차 혼성화 반응의 배경 측정에 의한 양성과 위양성 프로브의 검출, 동형 접합체(homozygote)와 이형 접합체(heterozygote)의 구별, 및/또는 유전자형 확정(genotyping)을 위한 음성 조절 (negative control) 프로브를 더 포함하고, 상기 음성 조절 프로브와 QC 프로브를 하나의 스팟에 함께 함유하는 것을 특징으로 한다.
- <37> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 상기와 같은 본 발명의 마이크로어레이를 이용하여 약제 내성 HBV의 검출, 마이크로어레이의 고정화 및 혼성화 반응 과정에서의 품질관리, 및 한가지 이상의 다른 유형의 혼합 여부와 정도의 검출, 비특이적 교차 혼성화 반응의 배경 측정에 의한 양성과 위양성 프로브의 검출, 동형 접합체(homozygote)와 이형 접합체(heterozygote)의 구별, 및/또는 유전자형 확정(genotyping) 중 하나 이상을 동시에 수행하는 것을 특징으로 하는 검출 방법을 제공한다.
- <38> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 상기와 같은 본 발명의 마이크로어레이를 포함하는 B형 간염 바이러스(HBV) 감염 진단 키트를 제공한다.
- <39> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 서열 번호 1 내지 47 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 B형 간염 바이러스(HBV)의 약제 내성을 검출하기 위한 프라이머 또는 프로브와 서열 번호 48 내지 83 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 한가지 이상의 다른 유형의 혼합여부와 정도의 검출, 비특이적 교차 혼성화 반응의 배경 측정에 의한 양성과 위양성 프로브의 검출, 동형 접합체(homozygote)와 이형 접합체(heterozygote)의 구별, 및/또는 유전자형 확정(genotyping)을 위한 음성 조절 (negative control) 프로브를 제공한다.

- <40> 본 발명의 음성 조절(negative control) 프로브는 서열 번호 48 내지 83 이외에도, B형 간염 바이러스(HBV)의 약제 내성을 검출하기 위한 프로브(예컨대, 서열 번호 7 내지 47)의 표적 코돈(약제 내성 관련 코돈)이 치환, 삽입 또는 결실된 것을 포함할 수 있다.
- <41> 본 발명의 오리고뉴클레오티드는 비록 한 가닥의 염기서열만을 기재하였지만, 표적 산물인 DNA 이중가닥 중 어느 가닥에 대해서도 프라이머 또는 프로브 디자인이 가능하므로, 본 발명의 권리범위는 상기 서열번호들의 센스(sense) 또는 안티센스(antisense) 염기서열을 모두 포함하는 것으로 해석되어진다.
- <42> 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- <43> 본 발명은 지지체에 부착된 B형 간염 바이러스의 약제 내성을 검출하기 위한 프로브를 포함하는 마이크로어레이를 제공한다. 또한, 본 발명은 형광물질로 표지된 QC 프로브와 약제 내성 HBV 검출을 위한 표적 프로브를 일정 비율로 혼합하며 또한 음성 조절(negative control) 프로브와 QC 프로브를 혼합하여 마이크로어레이의 지지체에 고정하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조되고 형광물질로 표지된 QC 프로브와 음성 조절(negative control) 프로브를 함유하는 마이크로어레이를 제공한다.
- <44> 또한 본 발명에서 마이크로어레이에는 지지체 위 각각의 스팟에 표적 프로브인 약제 내성 HBV 검출용 프로브와 형광물질이 표지된 QC 프로브를 함께 혼합하여 함유하며, 또한 각 코돈에 대한 음성 조절(negative control) 프로브와 형광물질이 표지된 QC 프로브를 혼합하여 이를 한 세트로 하여 다수의 세트를 포함하는 것을 특징으로 한다. 이로써, 단 1회의 실험으로 다수의 검체로부터 동시에 약제 내성 HBV의 검출 및 진단과 마이크로어레이 제작 시에 프로브의 고정화 및 혼성화 반응 과정에 관련하여 모든 마이크로어레이 각각의 프로브에 대한 신속·정확한 품질 관리와 한 가지 이상의 유형에 대한 혼합 여부와 혼합 정도의 결정과 표적 산물과의 비

특이적 교차 혼성화 반응에 의한 배경 측정으로 표적 산물에 대한 양성과 위양성 프로브의 결정이 가능한 방법을 제공한다.

<45> 또한 본 발명에서, QC 프로브는 QC 프로브를 별도로 사용하지 않고 표적 프로브 또는 그 일부에 표적 산물과 다른 형광물질을 붙여 사용할 수도 있다. 이 경우, 하나의 프로브로 프로브의 고정화 상태 및 표적 산물과 표적 프로브의 혼성화 반응의 겸중을 함께 수행할 수 있다. QC 프로브에 표지된 형광물질은 표적 산물에 표지된 형광물질과는 다른 여기/방출(excitation/emission) 파장을 가지는 것을 특징으로 한다. 이로써, 진단이나 연구용 등의 본 실험 전에 마이크로어레이를 특정한 파장의 형광물질로 표지된 QC 프로브를 분석함으로서 접촉된 프로브에 대한 겸중을 한 후에도, 본 실험에서 상호 간섭(spectral interference) 없이 지지체에 부착된 프로브와 혼성화 반응에 대한 겸중을 할 수 있다.

<46> 본 발명에서의 QC 프로브에 표지된 형광물질은 표적 산물과 다른 파장을 갖는 어느 형광물질도 사용할 수 있으며, 예컨대, 표적 산물과 표적 프로브의 결합 반응 유무를 확인하기 위해 Cy5 형광물질을 사용하는 경우, QC 프로브는 Cy3 또는 TAMRA 등의 다른 파장의 형광 물질을 이용할 수 있다. 본 발명에서, QC 프로브는 기존의 일반 지지체에 부착된 프로브와 같이 표적 산물의 염기서열과 서로 상보적인 서열을 가지거나 임의의 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 이때, 형광물질은 상기 올리고뉴클레오티드의 염기 서열 중 하나 또는 그 이상의 자리에 표지될 수 있으며, 그 위치는 QC 프로브의 3' 말단, 5' 말단 또는 중간 등 프로브의 어떠한 위치에도 표지가 가능하다. 또한, QC 프로브는 프로브의 염기서열과 형광물질 사이에 스페이서(spacer)를 두거나 두지 않을 수도 있다. 이때 스페이서는 혼성화에 영향을 주지 않고 형광물질과 프로브를 연결(link)할 수 있는 어떤 문자도 가능하며, 예컨대 C-3 linker, C-6 linker, C-6 TFA linker, C-5 amino modifier, C-12 linker, Amino dT C2 linker, Amino dT C6

linker, 3' branched amino CPGs, 3' C3 amino modifier, 3' C7 amino modifier, 5" Thiol C-2 linker, 5' Thiol C-6 linker, 5' Thiol C-6 S-S, 3' Thiol C3 등을 포함할 수 있다. 또한 QC 프로브는 프로브와 지지체 사이에도 스페이서를 두거나 두지 않을 수 있는데, 이때 스페이서는 혼성화에 영향을 주지 않고 프로브와 지지체를 연결할 수 있는 어떤 분자도 가능하며, 예컨대 C-3 linker, C-6 linker, C-6 TFA linker, C-5 amino modifier, C-12 linker, Amino dT C2 linker, Amino dT C6 linker, 3' branched amino CPGs, 3' C3 amino modifier, 3' C7 amino modifier, 5" Thiol C-2 linker, 5' Thiol C-6 linker, 5' Thiol C-6 S-S, 3' Thiol C3 등을 포함할 수 있다.

<47> 본 발명은 상기 QC 프로브를 표적 프로브와 하나의 스팟에 함유하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이를 제공한다. 따라서, 본 발명에서 마이크로어레이에는 그 용도에 따라 서로 다른 표적 프로브를 함유할 수 있으며, 상기와 같은 QC 프로브에 의해 프로브의 고정화 여부와 스팟 모양, 농도 등의 상태 검증 및 표적 산물과의 혼성화 반응 과정에 대한 검증을 할 수 있다.

<48> 본 발명에서, 음성 조절(negative control) 프로브는 각 코돈에 대한 야생형과 돌연변이의 검출하고자하는 염기서열을 함유하는 표적 프로브 외에 표적 프로브의 염기서열을 기초로 하여 하나 이상의 염기서열을 치환(substitution), 삽입(insertion)과 결실(deletion) 등의 방법에 의해 표적 프로브를 인위적으로 변형시켜 혼성화 되지 않도록 고안된 프로브로서 마이크로어레이의 종류에 따라 cDNA, 올리고뉴클레오티드, PNA, 펩타이드 또는 단백질 등과 같은 어떤 바이오 물질도 될 수 있다.

<49> 본 발명에서, 약제 내성 HBV를 검출하기 위한 표적 프로브는 약제 내성을 유도하는 표적 유전자에 특이적으로 결합 반응할 수 있는 염기서열, 예를 들면, 라미

부딘(lamivudine)과 팜시클로비어(famciclovir) 등에 대한 내성을 유도하는 표적 염기서열을 갖는 어떤 올리고뉴클레오티드도 포함하나, 바람직하게는 라미부딘 내성을 유도하는 HBV DNA polymerase 유전자의 C 영역 내의 YMDD motif의 코돈 552, 548과 555 부위와 B 영역의 코돈 528, 529와 514 부위의 점들연변이 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드와 팜시클로비어 내성을 유도하는 HBV DNA polymerase 유전자의 B와 C 영역의 코돈 528, 529와 555 부위의 점들연변이 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하며, 더욱 바람직하게는 서열번호 7 내지 47의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오티드(라미부딘 내성 검출용)와 서열번호 15 내지 25의 염기서열 및 서열번호 45 내지 47를 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오티드(팜시클로비어 내성 검출용)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

<50> 라미부딘에 내성을 갖는 변이종은 HBV DNA polymerase 유전자의 C 영역(C domain) 내의 YMDD motif(tyrosine-methionine-aspartate-aspartate)에서 코돈 552 부위의 메티오닌(methionine)이 발린(valine)으로 치환된 YVDD 형태(M552V)와 아이소루신(isoleucine)으로 치환된 YIDD(M552I) 형태가 주를 이루고 있다. 이러한 염기변화로 라미부딘과 HBV 중합효소(polymerase) 사이의 상호관계가 변화되어 중합효소 기능을 억제하지 못하게 된다. 메티오닌이 아이소루신이나 발린으로 치환되면 측면 사슬(side chain)이 작아져 라미부딘의 결합 포켓(binding pocket)에 변화가 생겨 라미부딘의 부착 부위 친화도가 감소함으로써 발생한다. HBV 내성은 또한 polymerase 유전자의 보존된 B 영역(conserved B domain)의 코돈 528 부위의 류신(leucine)이 메티오닌으로 치환된 형태(L528M)의 주요 돌연변이가 발생한다고 보고되고 있다. 따라서, 라미부딘 내성 관련 돌연변이는 크게 두 그룹으로 구분되는데, 그룹 I은 B와 C 영역에서 이중 돌연변이(L528M와 M552V)를 나타내며, 그룹 II는 C 영역에서의 단일 돌연변이(M552I)를 나타낸다(Nafa S, Ahmed S, Tavan D, Pichoud C, Berby F, and Stuyver L, et al.).

Hepatology, 32: 1078-1088, 2000, Fabien Zoulim. J Clin Virol., 21: 243-253, 2001). 또한, HBV DNA polymerase 유전자의 B와 C 영역의 코돈 528과 555 부위는 다른 뉴클레오사이드 유사체인 팜시클로비어(famciclovir) 내성과 관련이 있는 것으로 보고되었다(Xiong X, Yang H, Westland CE, Zou R, and Gibbs CS. Hepatology. 31: 219-224, 2000, Anna S. F. Lok, Fabien Zoulim, Stephen Locarnini, and Alessandra Mangia, et al. J Clin Microbiol., 40: 3729-3734, 2002). 또한, 코돈 552와 528 외에 코돈 514, 529와 548 부위가 라미부딘과 팜시클로비어 내성에 관련있는 것으로 보고되고 있으며, 코돈 552 부위의 돌연변이에서 발린과 아이소류신 외에 세린(serine)이 라미부딘 내성 관련 돌연변이 유형으로 보고되었다(Karl P. Fischer, Klaus S. Gutfreund, and D. Lorne Tyrrell. Drug Resist Updat. 4: 118-128, 2001, Chau-Ting Yeh, Rong-Nan Chien, Chia-Ming Chu, and Yun-Jan Liaw. Hepatology. 31: 1318-1326, 2000, Hubert G. M. Niesters, Robert A. de Man, and Suzan D. Pas, et al. J. Med. Microbiol. 51: 659-699, 2002).

<51> 본 발명에서의 마이크로어레이와 같은 DNA 혼성화 반응(hybridization)과 역 혼성화 반응(reverse hybridization)을 이용하는 경우 제한된 지역 내의 점돌연변이에 의한 약제 내성을 쉽게 확인할 수 있다(Rossau R., Traore H., De Beenhouwer H., Mijs W., Jannes G., De Rijk P., Portaels F. Antimicrob Agents Chemother, 41: 2093-2098, 1997). 또한, 역 혼성화 반응을 이용하는 경우 야생형(wild-type)과 돌연변이 바이러스 집단이 혼합된 경우, 염기서열분석법 보다 초기에 내성 돌연변이를 검출할 수 있으며, 야생형과 돌연변이 모두를 검출할 수 있는 큰 장점을 가지고 있다(Anna S. F. Lok, Fabien Zoulim, Stephen Locarnini, and Alessandra Mangia, et al. J Clin Microbiol., 40: 3729-3734, 2002).



1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

- <52> 본 발명에서의 약제 내성 B형 간염 바이러스의 검출 방법은 각각의 약제에 대한 염기서열 변화에 의한 돌연변이 검출에 기초하였다. 항바이러스 제재에서 표적 염기서열의 야생형과 돌연변이 검출을 위해 고안된 프로브를 당업계에 잘 알려진 편(pin) 또는 잉크젯(inkjet) 마이크로어레이와 같은 통상을 방법으로 고형지지체에 부착하여 마이크로어레이를 제작하였다. 한번의 실험으로 다양한 돌연변이 검출이 가능하며, 숙련된 실험자를 필요로 하는 고가의 기존 약제 내성 HBV 검출 방법에 비해 단시간에 정확하고 보다 편리하게 돌연변이를 검출함으로서 조속한 약제 내성 여부 확인으로 효과적인 B형 간염 치료를 가능하게 하는 검사법이다.
- <53> 본 발명은 마이크로어레이를 이용하여 B형 간염 바이러스의 약제 내성 검출과 마이크로어레이의 품질 관리를 동시에 수행하는 방법과 한 가지 이상의 유형에 대한 혼합 여부 및 정도 와 표적 산물에 대한 양성과 위양성 프로브의 결정을 가능하게 하는 방법을 제공한다. 즉, 각각의 스팟에 표적 프로브와 QC 프로브를 혼합하여 지지체에 고정화 시키고, 표적 산물을 혼성화 반응시킨 후, 표적 산물과 프로브의 결합유무를 확인하여 약제 내성 HBV의 검출 및 마이크로어레이의 스팟 및 혼성화 반응 과정에서의 품질 관리를 동시에 수행할 수 있으며, 각 코돈에 대한 야생형과 돌연변이 등의 한 가지 이상의 유형에 대한 혼합 여부 및 정도의 결정과 비특이적 교차 혼성화 반응에 의한 양성과 위양성 프로브의 결정을 가능하게 한다.
- <54> 본 발명의 마이크로어레이를 포함하는 B형 간염 바이러스 감염 진단 키트를 제공한다. 본 발명의 진단 키트에는 표적 프로브와 QC 프로브 및 음성 조절(negative control) 프로브를 포함하는 본 발명의 마이크로어레이 외에 혼성화 반응용액, 표적 산물을 증폭하기 위한 프라이머가 포함된 PCR 키트, 비혼성화 반응 DNA 세척용 용액, 커버슬립, 염료, 비염료 결합 세척용 용액 및 사용설명서 등을 더 포함할 수 있다.

<55> 이하, 실시 예를 기초로 하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 단, 이들 실시 예는 본 발명의 예시일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 만으로 제한되는 것은 아니다.

<56> 실시 예 1 : HBV DNA 분리

<57> B형 간염 환자로부터 채혈한 혈액은 즉시 냉장 보관하여 한 시간 동안 혈액응고 후, 3000 rpm에서 5분간 혈청을 원심분리하였다. 확보된 혈청은 -70°C에서 보관하였으며, 이들의 DNA를 추출하기 위해서는 QIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN Inc., CA, USA)를 사용하였다. 키트를 이용하여 혈청에서 최종적으로 200 μl의 HBV DNA를 확보하였다. 이를 PCR 반응의 주형 DNA로 사용하였다.

<58> 실시 예 2 : HBV의 검출과 약제 내성 HBV의 검출을 위한 표적 프로브 제작

<59> 본 발명에 사용된 올리고뉴클레오티드 프로브 및 프라이머는 퍼킨-엘머 DNA 합성기 (Perkin Elmer DNA Synthesis, USA)를 사용해 5' 말단에 5'-Amino-Modifier C6-15개의 염기를 갖는 길이의 dT 스페이서 및 15-25개의 염기서열을 갖는 프로브를 합성하여 PAGE 정제하여 제작하였다. 본 발명에서 제작된 표적 프로브와 프라이머는 아래 표1과 같다.

<60> 표 1에서, 서열번호 1 내지 6은 HBV DNA polymerase 유전자에 대한 정방향 및 역방향 프라이머로서, 서열번호 1, 2는 1차 PCR 반응을 위한 바깥 프라이머(outer primer)이며, 서열번호 3 내지 6은 바이오틴이 표지된 프라이머로서 안쪽 프라이머 (inner primer)로 이용하였다. 또한, 서열번호 7 내지 14는 라미부딘 검출용 프로브로서, 서열번호 7, 8은 코돈 514의 야생형 검출을 위한 프로브이며, 서열번호 9 내지 14는 코돈 514의 돌연변이 검출을 위한 프로브이다. 서열번호 15 내지 25와 45 내지 47은 라미부딘과 팜시클로비어에 대한 프로브로서, 서열번호 15 내지 16은 코돈 528의 야생형 검출용 프로브이고, 서열번호 17은 코돈 528의 돌연변이 검출



1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

용 프로브이고, 서열번호 18 내지 21은 코돈 529의 야생형 검출용 프로브이고, 서열번호 22 내지 25는 코돈 529의 돌연변이 검출용 프로브이고, 서열번호 45, 46은 코돈 555의 야생형 검출용 프로브이고, 서열번호 47은 코돈 555의 돌연변이 검출용 프로브이다. 서열번호 26 내지 44는 라미부딘 검출용 프로브로서, 서열번호 25 내지 29는 코돈 548의 야생형 검출용 프로브, 30 내지 33은 코돈 548의 돌연변이 검출용 프로브이고, 서열번호 34는 코돈 552의 야생형 검출용 프로브이고, 서열번호 35 내지 44는 코돈 552에 대한 돌연변이 검출용 프로브이다.

<61> 【표 1】

약제 내성 HBV의 검출을 위한 표적 프로브 및 프라이머

코 드 (항바이러스 제 재)	프라이머 및 프로브 이름	염기서열	서열 번호
프라이머	BF105	TCCCTGCTGCTATGCCTCATC	1
	BR112	TCCCCTTAACCTTCATGGGATATGTCGACGGAA	2
	HB-F	5'-biotin-AGTGGGCCCTCAGTCCGTTTC-3'	3
	HB-R	5'-biotin-TGGTATTGGGGCCAAGTCT-3'	4
	HB-F2	5'-biotin-CCATCATCTGGGCTTCGC-3'	5
	HB-R2	5'-biotin-TACCGCTGTTACCAATTTCCTTTG-3'	6
514 (lamivudine)	514WF1	5'-T ₁₅ -TGGGCTTCGCAAAA-3'	7
	514WF2	5'-T ₁₅ -TGGGCTTCCGCAAAA-3'	8
	514ML1	5'-T ₁₅ -TGGGCTTACGCAAAA-3'	9
	514ML2	5'-T ₁₅ -TGGGCTTGCACGCAAAA-3'	10
	514ML3	5'-T ₁₅ -TGGGCTTCGCAAAA-3'	11
	514ML4	5'-T ₁₅ -TGGGCTCCGCAAAA-3'	12
	514ML5	5'-T ₁₅ -TGGGCTTACGCAAAA-3'	13
	514ML6	5'-T ₁₅ -TGGGCTTAGGCAAAA-3'	14
528 (lamivudine & famciclovir)	528WL1	5'-T ₁₅ -GTTTCTCCTGGCTCA-3'	15
	528WL2	5'-T ₁₅ -GTTTCTCTTGGCTCA-3'	16
	528MM	5'-T ₁₅ -GTTTCTCATGGCTCA-3'	17
529 (lamivudine & famciclovir)	529WA1	5'-T ₁₅ -TCTCTTGGCTCAGTT-3'	18
	529WA2	5'-T ₁₅ -TCTCTTGGCCCCAGTT-3'	19
	529WA3	5'-T ₁₅ -TCTCTTGGCACAGTT-3'	20
	529WA4	5'-T ₁₅ -TCTCTTGGCGCAGTT-3'	21
	529MT1	5'-T ₁₅ -TCTCTTGACTCAGTT-3'	22
	529MT2	5'-T ₁₅ -TCTCTTGACCCAGTT-3'	23
	529MT3	5'-T ₁₅ -TCTCTTGACACAGTT-3'	24
	529MT4	5'-T ₁₅ -TCTCTTGCGCGCAGTT-3'	25
548 (lamivudine)	548WA1	5'-T ₁₅ -TGTCTGGCTTCAGT-3'	26
	548WA2	5'-T ₁₅ -TGTCTGGCCTTCAGT-3'	27
	548WA3	5'-T ₁₅ -TGTCTGGCATTTCAGT-3'	28
	548WA4	5'-T ₁₅ -TGTCTGGCGTTCAAGT-3'	29
	548MV1	5'-T ₁₅ -TGTCTGGTTTCAGT-3'	30
	548MV2	5'-T ₁₅ -TGTCTGGCTTCAGT-3'	31
	548MV3	5'-T ₁₅ -TGTCTGGTATTCAAGT-3'	32
	548MV4	5'-T ₁₅ -TGTCTGGTGTTCAGT-3'	33

<62>

552 (lamivudine)	YMDD	5'-T ₁₅ -TCAGTTATATGGATGATG-3'	34	
	YVDD	5'-T ₁₅ -TCAGTTATGTGGATGATG-3'	35	
	YIDD1	5'-T ₁₅ -CAGTTATATAGATGATG-3'	36	
	YIDD2	5'-T ₁₅ -CAGTTATATCGATGATG-3'	37	
	YIDD3	5'-T ₁₅ -CAGTTATATTGATGATG-3'	38	
	YSDD1	5'-T ₁₅ -CAGTTATAGTGATGATG-3'	39	
	YSDD2	5'-T ₁₅ -CAGTTATAGCGATGATG-3'	40	
	YSDD3	5'-T ₁₅ -CAGTTATTCTGATGATG-3'	41	
	YSDD4	5'-T ₁₅ -CAGTTATTCCGATGATG-3'	42	
	YSDD5	5'-T ₁₅ -CAGTTATTCAAGATGATG-3'	43	
	YSDD6	5'-T ₁₅ -CAGTTATTCCGGATGATG-3'	44	
	555 (lamivudine & famciclovir)	555WV	5'-T ₁₅ -GATGATGTGGTATTGGG-3'	45
		555MI1	5'-T ₁₅ -GATGATATTGTATTGGG-3'	46
		555MI2	5'-T ₁₅ -GATGATATAAGTATTGGG-3'	47

<63> 실시예 3 : 형광 염료로 표지된 QC 프로브 제작

<64> QC 프로브에 표지된 형광물질은 표적 프로브에 이용하는 형광물질과는 파장이 다른 물질을 선택한다. 예로 올리고뉴클레오티드칩에서 표적 산물과 표적 프로브의 결합 반응을 확인하기 위한 형광물질을 670nm의 emission filter를 사용하는 Cy5를 선택한 경우, 품질검사를 위한 QC 프로브에 표지되는 형광물질은 570nm 대의 파장을 갖는 Cy3 또는 TAMRA 등 본 실험의 표적 산물과 표적 프로브의 염색에 사용하는 형광물질과 다른 파장을 갖는 형광물질을 합성에 이용한다. cDNA chip의 경우, Cy3와 Cy5를 프로브에 이용하는 경우, 이들과 다른 제3의 파장을 갖는 형광물질을 품질검사를 위한 프로브 합성에 이용한다.

<65> 본 발명에서의 QC 프로브에 표지된 형광물질은 하기 표 2에 나열된 물질 중에서 선택된 어느 1종 이상의 물질을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않고 표적 산물과 다른 파장을 갖는 어느 형광물질도 사용할 수 있다.

<66>

【표 2】

마이크로어레이 제작 시 품질 관리에 사용 가능한 형광물질.			
형광물질	Excitation (nm)	Emission (nm)	Emission filter
Pyrene	340	376, 395	430
Cyanine 2	489	506	508
GFP	488	507	508
Calcein	494	517	522
FITC	494	518	522
Alexa 488	490	520	522
FAM	490	520	522
Fluorescein Chlorotriazinyl	492	514	522
Fluorescein	494	517	522
Rhodamine 110	500	525	522
Oregon Green	500	524	522
Magnesium Green	506	531	530
Calcium Green	506	533	530
JOE	524	550	549
Cyanine 3	550	570	570
Tetramethylrhodamine	550	570	570
TRITC	547	572	570
TAMRA	560	582	578
Rhodamine Phalloidin	550	575	578
Pyronin Y	555	580	578
Lissamine	570	590	592
ROX	588	608	614
Calcium Crimson	590	615	614
Texas Red	595	615	614
Nile Red	549	628	630
Cyanine 5	649	670	670
Thiadicarbocyanine	651	671	670

<67> 실시 예는 염색을 위해 Cy5 형광물질을 이용하였고, QC 프로브 제작에는 TAMRA 형광물질을 이용하여 5'-Amino-Modifier C6 20~50 mer-TAMRA QC 프로브를 고안하였고, 본 실험에서 사용한 QC 프로브의 염기서열은 다음과 같다.

<68> 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-TAMRA-3'

<69> 5'-TTT TTT TTT TTT Tgg Tgg ggT gTg gTg TTT gA-TAMRA-3'

- <70> 도 2에서 보듯이, QC 프로브는 지지체 위에 spacer를 두고 그 위에 각각의 표적 프로브와 동일한 염기서열 또는 임의의 염기서열을 두고 그 위에 직접 형광물질을 가지는 프로브와 염기서열과 형광물질 사이에 spacer를 두는 프로브를 사용할 수 있다.
- <71> 실시 예 4 : 음성 조절(Negative control) 프로브 제작
- <72> 본 발명에 사용된 negative control 프로브는 그 염기서열만을 달리하여 표적 프로브와 동일한 방법으로 제작하였다. 또한, negative control 프로브의 염기서열은 각 코돈의 표적 프로브들의 염기서열을 바탕으로 치환, 삽입과 결실 등의 인위적인 변형에 의하여 디자인하였으며, 본 발명에서 제작된 negative 프로브는 아래 표의 서열번호 18 내지 53과 같다. 아래의 negative 프로브는 본 발명에 사용된 예시일 뿐, 하나 이상의 염기서열에 대해 치환, 삽입과 결실에 의해 다양하게 고안 및 제작 될 수 있다. 이를 프로브 만으로 제한되는 것은 아니다.
- <73> 표 3에서, 서열번호 48 내지 54는 코돈 528에 대한 음성 조절 프로브이고, 서열번호 55 내지 67은 코돈 552에 대한 음성 조절 프로브이고, 서열번호 68 내지 83은 코돈 555에 대한 음성조절 프로브이다.

<74> 【표 3】

음성 조절 프로브

코돈 (인위적인 변형 방법)	프로브 이름	염기서열	서열 번호
528 (치환)	528N-C	5'-T ₁₅ -GTTTCTCG TGGCTCA-3'	48
528 (삽입)	528N-I-T	5'-T ₁₅ -GTTTCTCT CTGGCTC-3'	49
	528N-I-A	5'-T ₁₅ -GTTTCTCA CTGGCTC-3'	50
	528N-I-G	5'-T ₁₅ -GTTTCTCG CTGGCTC-3'	51
	528N-I-C	5'-T ₁₅ -GTTTCTCC CTGGCTC-3'	52
528 (결실)	528N-D-1	5'-T ₁₅ -GTTTCTCTGGCTCAG-3'	53
	528N-D-2	5'-T ₁₅ -CGTTTCTTGGCTCAG-3'	54
552 (치환)	552N-C-C	5'-T ₁₅ -TCAGTTATC TGGATGAT-3'	55
	552N-C-T	5'-T ₁₅ -TCAGTTATT TGGATGAT-3'	56
552 (삽입)	552N-I-A	5'-T ₁₅ -AGTTATATGA GATGATG-3'	57
	552N-I-C	5'-T ₁₅ -AGTTATATGC AGATGAT-3'	58
	552N-I-G	5'-T ₁₅ -AGTTATATGG AGATGAT-3'	59
	552N-I-T	5'-T ₁₅ -AGTTATATGT AGATGAT-3'	60
	552N-I-AG	5'-T ₁₅ -GTTATATGAG AGATGAT-3'	61
	552N-I-TC	5'-T ₁₅ -GTTATATGTC AGATGAT-3'	62
552 (결실)	552N-D-1	5'-T ₁₅ -TCAGTTATTGGATGATG-3'	63
	552N-D-2	5'-T ₁₅ -TCAGTTATGGATGATGA-3'	64
	552N-D-3	5'-T ₁₅ -TCAGTTATATGATGATG-3'	65
	552N-D-4	5'-T ₁₅ -TCAGTTATATATGATGA-3'	66
	552N-D-5	5'-T ₁₅ -TCAGTTATAGATGATGA-3'	67
555 (치환)	555N-C-TC	5'-T ₁₅ -GATGATT TC GTATTGGG-3'	68
	555N-C-CC	5'-T ₁₅ -GATGATC TC GTATTGGG-3'	69
555 (삽입)	555N-I-A	5'-T ₁₅ -GATGATGTA GGTATTGG-3'	70
	555N-I-T	5'-T ₁₅ -GATGATGTT GGTATTGG-3'	71
	555N-I-G	5'-T ₁₅ -GATGATGTC GGTATTGG-3'	72
	555N-I-C	5'-T ₁₅ -GATGATGTC GGTATTGG-3'	73
	555N-I-AC	5'-T ₁₅ -ATGATGTAC GGTATTGG-3'	74
	555N-I-TC	5'-T ₁₅ -ATGATGTT GGTATTGG-3'	75
	555N-I-GC	5'-T ₁₅ -ATGATGTC GGTATTGG-3'	76
	555N-I-AT	5'-T ₁₅ -ATGATGTT GGTATTGG-3'	77
	555N-I-GG	5'-T ₁₅ -ATGATGTC GGTATTGG-3'	78
555 (결실)	555N-D-1	5'-T ₁₅ -AGATGATGGTATTGGG-3'	79
	555N-D-2	5'-T ₁₅ -AGATGATGTTATTGGG-3'	80
	555N-D-3	5'-T ₁₅ -AGATGATTGGTATTGGG-3'	81
	555N-D-4	5'-T ₁₅ -AGATGATGGTATTGGGG-3'	82
	555N-D-5	5'-T ₁₅ -GAGATGATGTTATTGGGG-3'	83

<75> 실시 예 5 : 지지체에 프로브 부착



1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

<76> 실시 예 2에서 제작된 각각의 표적 프로브와 실시 예 4에서 제작된 negative control 프로브를 각각 30~50 pmol로 희석하여 도 1의 b 내지 c의 해당 위치에 부착하도록 96-well microplates에 분주하고 각 well에 실시 예 3에서 제작된 QC 프로브 1~5 pmol 및 Micro-spotting 용액 또는 3 x SSC 용액을 첨가하여 잘 혼합하였다. 본 실험에서는 QC 프로브 1 pmol과 표적 프로브 및 negative control 프로브 50 pmol을 혼합하였으나, 혼합비율은 QC 프로브가 결과 판독에 영향을 미치지 않는 농도이하에서는 변경이 가능하다. 슬라이드 글라스 또는 멤브레인(membrane) 등의 지지체에 혼합된 프로브를 마이크로어레이어(Cartesian Technologies, PLXSYS 7500 SQXL Microarrayer, USA)를 이용하여 프로브를 부착하였다. 한 종류의 프로브 당 두 개의 점(spot)을 지지체에 부착시킨 후, 실온의 슬라이드 박스에서 24시간 정도 정차 또는 50°C의 건조기(dry oven)에 약 5시간 방치하여 지지체 위의 표면에 고정시켰다.

<77> 실시 예 6 : 표적 산물 준비

<78> 약제 내성 HBV의 검출을 위한 표적 산물의 증폭을 위해 실시 예 2에서 제조된 바이오틴이 표지화된 정방향(forward)과 역방향(reverse) 프라이머를 사용하여 실시 예 1에서 분리된 DNA의 HBV polymerase 유전자의 B와 C영역의 코돈 514 내지 555 부위 모두를 포함하도록하여 약 200 bp 크기의 단편을 증폭하였다. 본 실험에서는 1차 PCR을 위해 BF105와 BR112 프라이머를 사용하였으며, 2차 PCR을 위해 HB-F2와 HB-R2의 바이오틴 프라이머를 사용하였다.

<79> PCR은 일·이차에 걸쳐 실시하였다. 일차 PCR은 BF105와 BR112 프라이머를 이용하여 실시 예 1에서 분리된 HBV DNA 4 μl와 함께 총 25 μl가 되도록 PCR 반응액을 준비하였다. 이 혼합액을 94°C에서 4 분간 반응시켜 충분히 변성시킨 후 94°C에서 1 분, 58°C에서 1 분, 72°C에서 1 분씩 30 회 반응시킨 후, 마지막으로 72°C에서 10 분간 연장하였다. 이차 PCR은 일차 PCR 산물

2 μl 와 바이오틴이 표지화된 HB-F2와 HB-R2 프라이머를 이용하여 일차 PCR 반응과 동일한 조건 하에서 시행하였다.

<80> 실시 예 7 : 프로브 고정화에 대한 품질 관리 조사

<81> 세척 전 슬라이드에 고정화된 프로브의 고정화 정도와 상태가 결과 분석에 중요한 영향을 미칠수 있으므로 세척 전의 상태를 확인하였다. 실시 예 5에서 제작된 마이크로어레이의 프로브 고정화 후, 세척 전의 슬라이드에서 프로브의 고정화 여부와 스팟의 상태를 레이저 스캐너(laser scanner)로 분석하였다. 도 3은 그 결과를 나타낸 것이며, 도 4는 실시 예 5와 모든 과정은 동일하지만, QC 프로브를 혼합하지 않은 경우의 레이저 스캐너를 이용하여 프로브 고정화 후, 세척 전의 마이크로어레이를 분석한 결과이다.

<82> 실시 예 8 : 고정화되지 않은 프로브 세척

<83> 실시 예 5 또는 실시 예 7의 과정을 마친 슬라이드에 고정화되지 않은 프로브를 세척하기 위하여 실시하였다. 실온에서 0.2% SDS 완충액을 이용하여 세척한 후, dH₂O를 이용하여 세척하였다. 다음 sodium borohydride(NaBH₄) 용액에 5분간 방치한 후, 100°C에서 세척하였다. 마지막으로 다시, 0.2% SDS와 dH₂O를 이용하여 세척한 후, 원심분리기를 이용하여 슬라이드를 완전하게 건조시켰다.

<84> 실시 예 9 : 혼성화 반응(Hybridization) 및 염료(dye) 결합

<85> 실시 예 6에서 제조된 바이오틴으로 표지화된 표적 산물을 열처리하여 단일 가닥으로 변성시킨 후, 4°C로 냉각시켰다. 1~5 μl 의 표적 산물을 포함하는 혼성화 반응 용액과 염료를 혼합하여 (20 SSPE 3 μl , 22.2M Formamide 1.35 μl , Bovine serum albumin 0.5 μl , Salmon sperm DNA 0.1 μl , Cy5-streptavidin (Amersham Pharmacia Biotech, USA) 0.06 μl) 총 10 μl 의 반응



1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

액을 제작하였다. 실시 예 8을 마친 슬라이드에 혼성화 반응 용액을 분주하고 기포가 생기지 않도록 커버 슬립을 덮은 뒤 빛을 차단한 후, 40°C에서 30분간 반응시켰다.

<86> 실시 예 10 : 결합되지 않은 표적 산물의 세척

<87> 혼성화 반응을 하지 않은 잔여의 표적 산물을 세척하기 위해 2 X SSC(300mM NaCl, 30mM Na-Citrate, pH 7.0) 세척 용액을 이용하여 커버 슬립을 제거한 후에 2 X SSC와 0.2 X SSC 용액 순으로 슬라이드를 세척하였다. 마지막으로 원심분리기를 이용하여 세척한 슬라이드를 완전하게 건조시켰다.

<88> 실시 예 11 : 결과 분석

<89> 결합 반응 분석을 위해 비공초점 레이저 스캐너(laser scanner)인 GenePix 4000A(Axon Instruments, USA)를 이용하여 스캐닝하고 화상분석을 통해 결과를 분석하였다.

<90> 도 1은 본 발명의 실시 예인 마이크로어레이의 도면으로, 도 1a에서 a)는 약제 내성 비형 간염 바이러스의 검출을 위한 표적(target) 프로브와 품질 관리를 위한 QC 프로브를 함유한 각각의 스팟을 한세트로 하여 하나의 지지체에 다수 세트로 구성하고 있는 마이크로어레이의 도면이다. b)는 a)중 한 세트의 프로브로 구성하고 있는 마이크로어레이의 도면이고, c)는 b)의 마이크로어레이의 프로브를 유형별 표기한 도면이다.

<91> 도 1b에서 a)는 약제 내성 비형 간염 바이러스의 검출을 위한 표적 프로브와 품질 관리를 위한 QC 프로브 및 한 가지 이상의 유형에 대한 혼합 여부 및 정도와 비특이적 교차 혼성화 반응에 의한 배경 측정을 위한 음성 조절(negative control) 프로브를 함유한 각각의 스팟을 한 세트로 하여 하나의 지지체에 다수 세트로 구성하고 있는 마이크로어레이의 도면이다. b)는



1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

a)중 한 세트의 프로브로 구성하고 있는 마이크로어레이의 도면이고, c)는 b) 의 마이크로어레이의 프로브를 유형별 표기한 도면이다.

<92> 도 1에서, P는 positive control probe이고, QC는 quality control probe이고, N1~N4는 각 codon에 대한 negative control probe이고, 528WL은 528WL1 프로브와 528WL2 프로브가 혼합되었음을 나타낸다. 코돈 552 부위에서 돌연변이 YVDD와 YIDD의 점돌연변이 위치 차이로 야생형(YMDD) 프로브의 길이(mer)에 차이를 두고 각각에 대한 야생형을 구성하였으며, 코돈 528의 야생형 프로브인 528WL1과 528WL2를 동일 자리에 혼합하여 부착하였다. Negative control 프로브는 각 코돈을 기준으로 구성하였으며, 코돈 552 부위에서는 점돌연변이 위치가 다른 YVDD와 YIDD 각각에 대해 negative control 프로브를 구성하였다. 또한, 이것은 본 발명에 따른 프로브 구획의 한 예에 불과하므로 각 프로브 구획의 위치(layout)는 변동될 수 있다.

<93> 도 2는 프로브의 고정화 및 혼성화 반응에 대한 검증에 이용되는 형광물질로 표지된 QC 프로브의 디자인으로, 지지체 위에 spacer를 두고 그 위에 각 표적 프로브의 염기서열 또는 임의의 염기서열을 두고 그 위에 직접 형광물질을 가지는 QC 프로브와 염기서열과 형광물질 사이에 spacer를 가지는 QC 프로브를 디자인한 그림이다. 형광물질로 표지된 n-mer의 QC 프로브 염기서열은 표적 프로브의 염기서열과 동일하거나, 또는 임의의 염기서열일 수도 있다.

<94> 도 3은 QC 프로브와 표적 프로브 그리고 QC 프로브와 negative control 프로브를 일정 비율로 혼합하여 슬라이드에 고정시킨 후 슬라이드를 세척 전에 스캐너로 분석한 결과로서, 지지체 위 프로브의 실제 고정화 여부 및 상태를 확인하기 위한 것이다. 스팟의 모양 및 크기가 대부분 동일하지만 지지체에 따라 스팟이 크거나 작음을 알 수 있다. 3a는 슬라이드에 고정시킨 프로브의 모양 및 농도 등의 고정화 상태가 양호함을 나타내며, 3b는 집적된 프로브의 모양과 농도가 일정하지 않으며 집적 과정 중의 문제 등으로 인해 여러 개의 프로브가 서로 붕쳐져



1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

혼합되었음을 확인할 수 있는 결과이며, 3c는 집적된 프로브의 모양과 농도가 일정하지 않으며 일부 프로브는 슬라이드에 집적되지 않았음을 확인할 수 있는 결과로, 3b 내지 3c의 경우, 최종적으로 실험 결과에 아주 큰 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있는 결과이며, 각 슬라이드에서 동일 양으로 집적된 프로브가 실제 고정화 후 집적된 프로브 농도 및 모양에 차이가 있음을 알 수 있다. 도 3d 내지 3e는 표적 프로브와 음성 조절 프로브를 일정 비율로 혼합하여 슬라이드에 고정시킨 후 슬라이드를 세척 전에 스캐너로 분석한 결과로서, 3d는 모든 프로브가 최적의 상태로 슬라이드에 고정된 결과를 나타내며, 3e는 일부 프로브에서 프로브의 모양 및 농도가 양호하지 않음을 확인할 수 있다.

<95> 도 4는 QC 프로브를 사용하지 않고 약제 내성 B형 간염 바이러스 검출용 표적 프로브만을 슬라이드에 고정시킨 후, 슬라이드를 세척하기 전에 스캐너로 분석한 결과로서, 도 3과 다르게 QC 프로브가 포함되지 않아 각각의 스팟에 대한 정보를 전혀 확인할 수 없다.

<96> 도 5는 HBV의 약제 내성 검출을 위한 프로브의 특이적 혼성화 반응의 결과로서, 5a는 약제에 대해 감수성(야생형)을 나타내는 HBV를 이용한 결과로, 도 1a의 c)에서 표적 프로브 중 positive, 528WL1, YMDD와 555WV 프로브에서 반응이 일어났다. 5b는 코돈 552 부위의 메티오닌(ATG)이 발린(valine, GTG)으로 치환된 것으로 도 1a의 c)에서 표적 프로브 중 positive, 528WL1, YVDD와 555WV 프로브에서 반응이 일어났으며, 5c는 코돈 552 부위의 메티오닌이 3가지 유형의 아이소류신(isoleucine, ATA; YIDD1, ATC; YIDD2, 그리고 ATT; YIDD3) 중 ATT(YIDD3) 유형으로 치환된 것으로 도 1a의 c)에서 표적 프로브 중 positive, 528WL1, YIDD3과 555WV 프로브에서 반응이 일어난 마이크로어레이의 분석 결과로서, 본 발명의 마이크로어레이를 통하여 약제에 대한 감수성여부를 확인할 수 있으며, 또한 돌연변이의 각 유형에 대해 신속, 정확하게 검출이 가능하다.

<97> 도 6은 두가지 이상의 유형이 혼합된 경우의 혼성화 반응 결과로서, 6a는 코돈 552 부위의 야생형(YMDD)과 돌연변이 YVDD가 혼합된 경우의 검출 결과로, 도 1a의 c)에서 표적 프로브 중 positive, 528WL1과 555WV 프로브가 검출되었고, 코돈 552 부위에서는 YMDD와 YVDD가 함께 반응이 일어나 검출되었으며, 6b는 코돈 528 부위의 돌연변이와 코돈 552 부위의 돌연변이가 함께(528MM과 YVDD) 혼합된 경우로 도 1a의 c)에서 표적 프로브 중 positive, 528MM, YVDD와 555WV 프로브가 검출된 결과이고, 6c는 3가지 돌연변이가 혼합된 경우로, 코돈 528 부위의 돌연변이(528MM)와 코돈 552 부위의 2가지 돌연변이(YVDD와 YIDD3)의 혼성화 반응 결과로 도 1a의 c)에서 표적 프로브 중 positive, 528MM, YVDD와 YIDD3, 그리고 555WV 프로브가 검출된 결과로서, 본 발명의 마이크로어레이를 통하여 도 5와 같이 하나의 유형만이 존재하는 경우는 물론이고, 동일 코돈에 대해서 야생형과 돌연변이 또는 서로 다른 유형의 돌연변이 등 두 가지 이상의 유형이 혼합된 경우에도 정확하게 검출이 가능함을 알 수 있다.

<98> 도 7은 도 6c의 2가지 유형의 돌연변이가 혼합된 경우의 결과로서, 코돈 552 부위의 돌연변이 YVDD와 YIDD3가 혼합된 경우의 염기서열분석 결과이다. 7a 내지 7b는 염기서열분석법에 의한 결과로, 7a는 점돌연변이 부위에서 어떠한 염기서열로도 나타내지 못하는 'N'으로 확인되었으며, 7b는 두가지 유형 중 YIDD3 유형만이 확인되었다. 7c는 본 발명에 의한 마이크로어레이 분석 결과로 두가지 이상의 유형이 혼합된 경우 두가지 유형의 돌연변이가 프로브가 분명하게 검출됨을 확인할 수 있다. 실험에 사용된 HBV DNA의 돌연변이 유형은 제한효소절편길이다 형성(RFLP; restriction fragment length polymorphism) 실험을 통해 YVDD와 YIDD3가 혼합된 것임을 확인하였다. 이는 도 6에서와 같이 두 가지 이상의 유형이 혼합된 경우에서 본 발명에 의한 마이크로어레이가 신속, 정확하게 혼합된 유형을 검출할 수 있음을 나타내는 결과로서, 라미부딘과 팜시클로비어 등의 항바이러스제제에 대해 대부분의 HBV는 두 가지 이상의 유형이

혼합된 경우로 존재하므로, 혼합된 유형을 정확하게 검출하는 것이 무엇보다 중요하다. 이에 본 발명의 마이크로어레이가 아주 유용함을 확인할 수 있다.

<99> 도 8은 음성 조절(negative control) 프로브를 이용하여 비특이적 교차 혼성화 반응의 배경을 측정한 결과이다. 8a와 8b는 도 1b에 대한 실제 마이크로어레이의 스캐닝 결과로서, a는 spot region 이외의 자리에 여분의 프로브가 부착되어있음을 확인할 수 있으며, 프로브 간의 부착된 농도에 차이가 있음을 확인할 수 있다. b는 프로브의 스팟팅 과정과 세척 과정 등에 의해 555M2 프로브가 부착되어있지 않음을 QC 프로브를 통해 확인할 수 있다. 8c와 8d는 약제 내성 HBV 검출을 위한 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응의 결과로, 각 코돈에서의 야생형과 돌연변이의 혼합 여부 및 정도 그리고 하나 이상의 돌연변이의 혼합 여부에 대해 스캐닝 결과에 의한 이미지만으로는 확인이 불가능하며, c와 d는 약제 내성 HBV 검출용 마이크로어레이의 각 프로브에 대한 스캐닝 이미지와 양적인 형광정도를 나타낸 결과로, 표준화된 형광의 시그널(normalized fluorescent signal)에 의해 각 프로브에 대한 형광 정도를 확인할 수 있다. 이때, negative control 프로브의 형광 정도에 의해 한 가지 이상의 유형에 대한 혼합 여부 및 정도를 확인 할 수 있으며, 각 프로브에 대한 양성과 위양성을 결정할 수 있다. 8c에서 코돈 528의 야생형, 코돈 552에서는 야생형인 YMDD와 YVDD 돌연변이가 혼합되었음을 알 수 있고, 이는 이미지 만으로는 혼합여부의 확인이 불가능 함을 알 수 있다. 8d에서는 코돈 528의 야생형과 돌연변이가 혼합되어있음을 확인할 수 있고, 코돈 552에서는 야생형의



1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

YMDD, 돌연변이로는 YVDD와 YIDD2가 혼합되어 존재함을 알 수 있다. 이러한, 각 프로브에 대한 양성과 위양성의 판단은 그래프에서 번호 3(N1, 코돈 528에 대한 negative control), 9(N2, YVDD에 대한 negative control), 15(N3, YIDD에 대한 negative control)과 21(N4, 코돈 555에 대한 negative control)이 negative control 프로브에 의해 나타나는 형광세기 보다 높으면 양성으로, 낮으면 음성 결과로 해석이 가능하다. 본 발명에 의한 마이크로어레이의 negative control probe를 이용함으로서 비특이적 혼성화 반응에 의한 배경을 측정하여 실제 표적 산물과 반응하는 양성의 프로브와 비특이적 혼성화 반응에 의한 위양성 프로브의 구별이 가능하며, 또한 한 가지 이상의 유형에 대한 단독으로 존재하는 경우와 혼합된 경우에서의 양성 프로브에 대한 정확한 검출이 가능하다. 또한, 야생형과 돌연변이가 혼합되어 있는 상태에서의 검출 방법과 동일한 방법 및 원리로부터 동형 접합체(homozygote)와 이형 접합체(heterozygote)의 구별 및 유전자형 확정(genotyping)이 가능하다.

【발명의 효과】

100> 이상에서 살펴 본 바와 같이, 본 발명은 하나의 지지체 위 각각의 스팟에 HBV의 약제 내성을 검출할 수 있는 표적 프로브와 형광물질이 표지된 QC 프로브, 그리고 한 가지 이상의 유형에 대한 혼합 여부 및 양성과 위양성 프로브를 검출 할 수 있는 negative control 프로브와 QC 프로브가 혼합되어 각각의 위치에 부착되어있는 마이크로어레이 검사 방법 및 진단 키트이다. 본 발명의 마이크로어레이를 이용하여 간단·정확하게 혼성화 반응 및 지지체 표면 위 표적 프로브의 품질 관리,

라미부딘과 팜시클로비어 등의 약제에 대한 내성 검출 그리고 야생형과 돌연변이 등의 한 가지 이상 유형의 혼합 여부·정도와 비특이적 교차 혼성화 반응의 배경 측정에 의한 양성 프로브와 위양성 프로브의 검출이 한번의 실험으로 동시에 가능하다. 즉, 마이크로어레이의 각 스팟에 표적 프로브와 함께 QC 프로브를 함유함으로서 표적 프로브에 대한 고정화 여부 및 모양, 농도 등의 상태에 대한 검사와 혼성화 반응 과정에서의 여러 가지 영향에 대한 검사 등 마이크로어레이의 제작 및 품질 검사와 라미부딘과 팜시클로비어 등의 약제에 대한 내성 검출이 동시에 가능하며, negative control 프로브와 QC 프로브가 혼합되어 negative control 프로브에 대한 고정화 여부 및 모양, 농도 등의 상태에 대한 검사와 야생형과 돌연변이 등의 한 가지 이상 유형의 혼합 여부·정도와 비특이적 교차 혼성화 반응의 배경 측정에 의한 양성 프로브와 위양성 프로브의 검출이 가능하다. Negative control 프로브는 HBV의 야생형과 돌연변이 검출뿐만 아니라 다른 미생물에도 적용이 가능하며, genotyping에도 적용이 가능하고, homozygote와 heterozygote 검출하는데 있어서도 negative control 프로브의 응용이 가능하다. 또한 하나의 고형지지체 위에 다수의 세트로 부착하여 한번의 실험으로 다수의 검체로부터 B형 간염 바이러스의 약제 내성에 대한 실험이 가능하여 진단에 필요한 시간을 기존의 상품화 된 방법보다 훨씬 단축시킬 수 있으며 비용 면에서도 매우 경제적이다. 야생형과 돌연변이가 혼합된 경우는 염기서열분석법 등의 기존 방법으로는 검출이 불가능하나 마이크로어레이 방법은 두가지 이상의 돌연변이가 혼합된 경우에서도 정확하게 검출 가능하며, 높은 민감도(sensitive)로 기존 방법보다 조기에 돌연변이 검출이 가능한 것으로, 단시간에 신속·정확하고 보다 편리하게 돌연변 이를 검출함으로서 조속한 약제 내성 여부 확인으로 B형 간염 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.



1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

【특허청구범위】

【청구항 1】

지지체에 부착된 B형 간염 바이러스(HBV)의 약제 내성을 검출하기 위한 표적 프로브(probes)를 포함하는 마이크로어레이.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 지지체는 슬라이드글라스, 멤브레인, 반도체 칩(semiconductive chip), 실리콘 또는 젤(gel)인 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 표적 프로브는 cDNA, 올리고뉴클레오티드, DNA 유사체 (analogues), 펩타이드 또는 단백질인 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 표적 프로브는 라미부딘(lamivudine) 및/또는 팜시클로비어(famciclovir)에 대한 내성을 유도하는 표적 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

【청구항 5】

제4항에 있어서, 표적 프로브는 라미부딘 내성을 유도하는 HBV DNA polymerase 유전자의 B 영역의 코돈 528, 529와 514 부위와 C 영역의 코돈 552, 548과 555 부위의 점돌연변이 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드, 및/또는 팜시클로비어 내성을 유도하는 HBV DNA polymerase 유전자의 B 영역의 코돈 528, 529 부위와 C 영역의 코돈 555 부위의 점돌연변이 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.



1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

【청구항 6】

제5항에 있어서, 표적 프로브는 서열번호 7 내지 47의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

【청구항 7】

제1항 또는 제6항중 어느 한 항에 있어서, 한가지 이상의 다른 유형의 혼합여부와 정도의 검출, 비특이적 교차 혼성화 반응의 배경 측정에 의한 양성과 위양성 프로브의 검출, 동형 접합체(homozygote)와 이형 접합체(heterozygote)의 검출, 및/또는 유전자형 확정(genotyping)을 위한 음성 조절 (negative control) 프로브를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

【청구항 8】

제7항에 있어서, 음성 조절 (negative control) 프로브는 표적 프로브의 염기서열 중 하나 이상의 염기서열을 치환, 삽입 또는 결실 등의 방법에 의해 인위적으로 변형시켜 표적 산물과 혼성화되지 않도록 고안된 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

【청구항 9】

제8항에 있어서, 음성 조절 (negative control) 프로브는 서열번호 48 내지 83의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.



1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

【청구항 10】

제1항 내지 제6항중 어느 한 항에 있어서, 표적 산물에 표지된 형광물질과 다른 여기/방출(excitation/emission) 파장을 가지는 형광물질로 표지된 QC 프로브와 표적 프로브를 하나의 스팟에 함께 함유하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

【청구항 11】

제10항에 있어서, QC 프로브는 표적 프로브와 동일하거나 임의의 염기서열을 가지며 염기서열의 하나 또는 그 이상의 자리에 형광물질로 표지된 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

【청구항 12】

제10항에 있어서, QC 프로브에 표지된 형광물질은 피레닌(Pyrene), 싸이아닌 2 (Cyanine 2), GFP, 칼세인(Calcein), FITC, 알렉사(Alexa 488), FAM, 플로레센 클로로트리아지닐(Fluorescein Chlorotriazinyl), 플로레센(Fluorescein), 로다민(Rhodamine 110), 오레건 그린(Oregon Green), 마그네슘 그린(Magnesium Green), 칼슘 그린(Calcium Green), JOE, 싸이아닌 3(Cyanine 3), 테트라메틸로다민(Tetramethylrhodamine), TRITC, TAMRA, 로다민 팔로이딘(Rhodamine Phalloidin), 피로닌 Y(Pyronin Y), 리싸민(Lissamine), ROX, 칼슘크림선(Calcium Crimson), 텍사스 레드(Texas Red), 나일 레드(Nile Red), 싸이아닌 5(Cyanine 5), 및 티아디카복시아닌(Thiadicarbocyanine)으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 물질인 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

【청구항 13】

제10항에 있어서, 한가지 이상의 다른 유형의 혼합여부와 정도의 검출 및 비특이적 교차 혼성화 반응의 배경 측정에 의한 양성과 위양성 프로브의 검출을 위한 음성 조절 (negative control) 프로브를 더 포함하고, 상기 음성 조절 프로브와 QC 프로브를 하나의 스팟에 함께 험유하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

【청구항 14】

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 마이크로어레이를 이용하여 약제 내성 HBV의 검출, 마이크로어레이의 고정화 및 혼성화 반응 과정에서의 품질관리, 및 한가지 이상의 다른 유형의 혼합 여부와 정도의 검출, 비특이적 교차 혼성화 반응의 배경 측정에 의한 양성과 위양성 프로브의 검출, 동형 접합체(homozygote)와 이형 접합체(heterozygote)의 검출, 및/또는 유전자형 확정(genotyping) 중 하나 이상을 동시에 수행하는 것을 특징으로 하는 검출 방법.

【청구항 15】

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 마이크로어레이를 포함하는 B형 간염 바이러스(HBV) 감염 진단 키트.

【청구항 16】

서열 번호 1 내지 47 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 B형 간염 바이러스(HBV)의 약제 내성을 검출하기 위한 프라이머 또는 프로브.

【청구항 17】

서열 번호 7 내지 47 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 B형 간염 바이러스(HBV)의 약제 내성을 검출하기 위한 프로브의 표적 코돈이 치환, 삽입 또는 결실되어 이루어진, 한가지

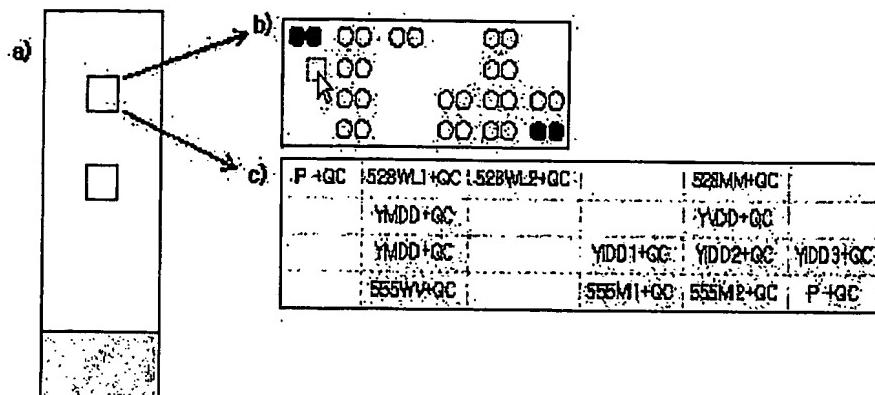
이상의 다른 유형의 혼합여부와 정도의 검출, 비특이적 교차 혼성화 반응의 배경 측정에 의한 양성과 위양성 프로브의 검출, 동형 접합체(homozygote)와 이형 접합체(heterozygote)의 검출, 및/또는 유전자형 확정(genotyping)을 위한 음성 조절 (negative control) 프로브.

【청구항 18】

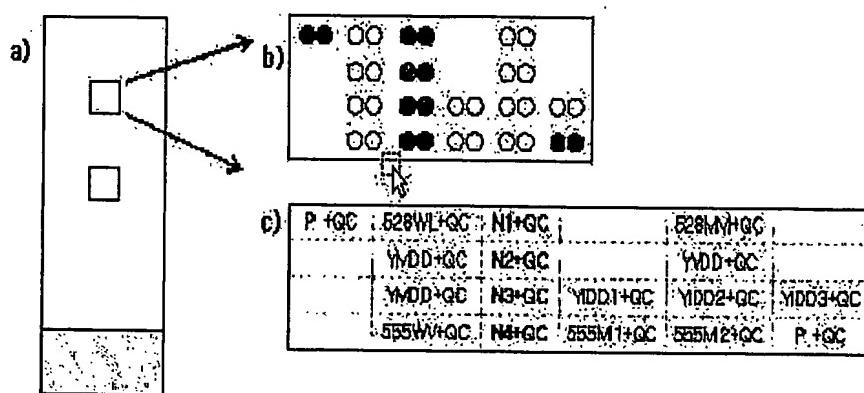
제17항에 있어서, 서열 번호 48 내지 83 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 음성 조절 (negative control) 프로브.

【도면】

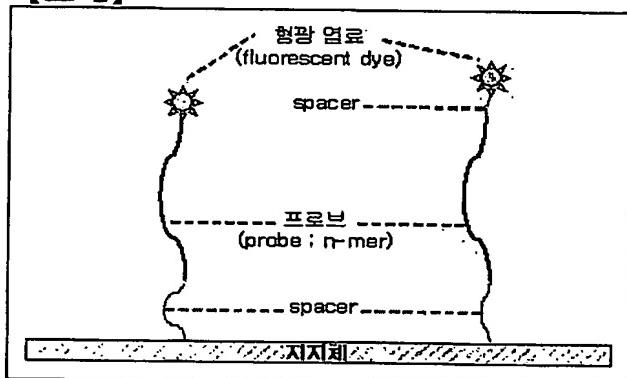
【도 1a】



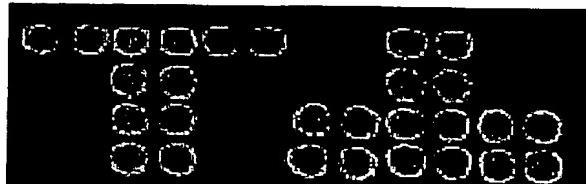
【도 1b】



【도 2】



【도 3a】



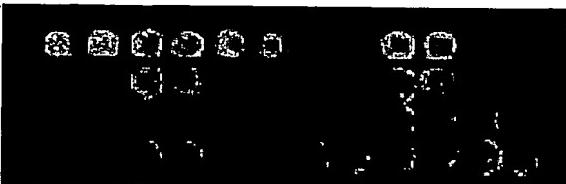
1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

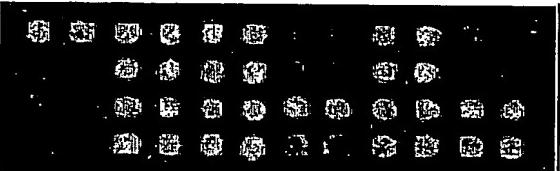
【도 3b】



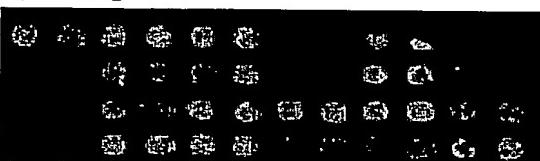
【도 3c】



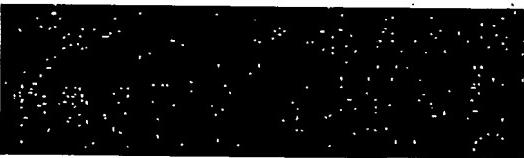
【도 3d】



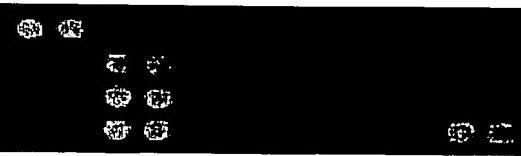
【도 3e】



【도 4】



【도 5a】



【도 5b】



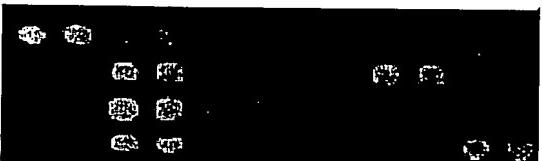
1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

【도 5c】



【도 6a】



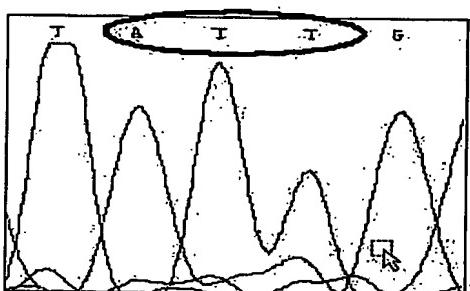
【도 6b】



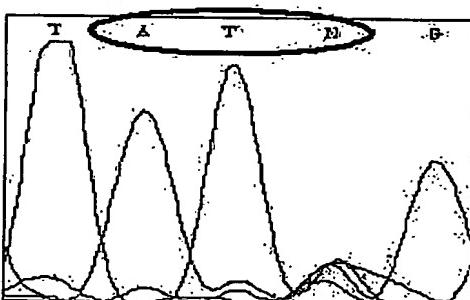
【도 6c】



【도 7a】



【도 7b】



1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

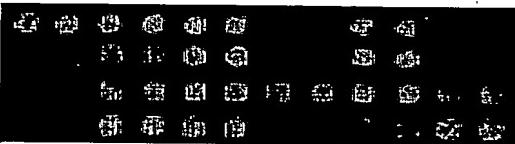
【도 7c】



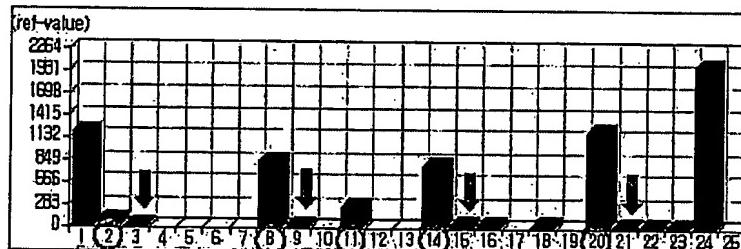
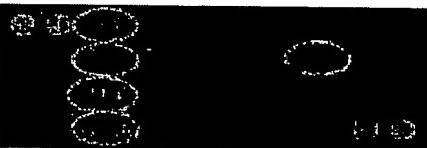
【도 8a】



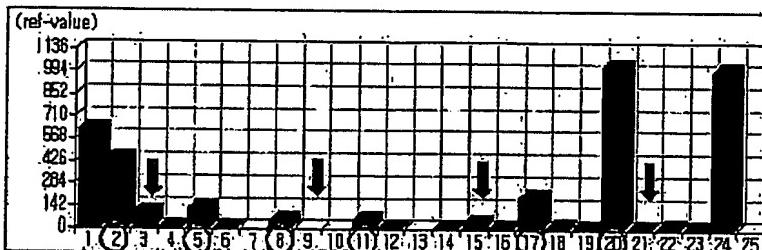
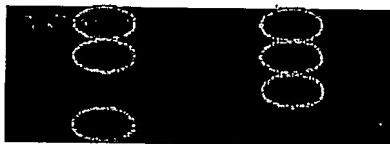
【도 8b】



【도 8c】



【도 8d】



【서열목록】

<110> KIM, Cheol Min <120> Microarray comprising probes for drug-resistant hepatitis B virus detection, quality control and negative control, and method for detecting hepatitis B virus using the same <130> Gn14828 <160> 83
<170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> BF105 primer <400> 1 tcctgctgct atgcctcatc
20 <210> 2 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
BR112 primer <400> 2 tcccttaact tcatggata tgtcgacgga a
31 <210> 3 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
HB-F primer <400> 3 agtgggcctc agtccgttc
20 <210> 4 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
HB-R primer <400> 4 tggtattggg gccaaagtct
19 <210> 5 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
HB-F2 primer <400> 5 ccatcatctt gggctttcgc
20 <210> 6 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
HB-R2 primer <400> 6 taccgctgtt accaatttc ttttg
25 <210> 7 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
514WF1 probe <400> 7 tgggcttccg caaaa
15 <210> 8 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
514WF2 probe <400> 8 tgggcttccg caaaa
15 <210> 9 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

514ML1 probe <400> 9 tgggcttacg caaaa
15 <210> 10 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
514ML2 probe <400> 10 tgggcttgcg caaaa
15 <210> 11 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
514ML3 probe <400> 11 tgggccttcg caaaa
15 <210> 12 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
514ML4 probe <400> 12 tgggcctccg caaaa
15 <210> 13 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
514ML5 probe <400> 13 tgggcctacg caaaa
15 <210> 14 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
514ML6 probe <400> 14 tgggcctagg caaaa
15 <210> 15 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
528WL1 probe <400> 15 gtttctcctg gctca
15 <210> 16 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
528WL2 probe <400> 16 gtttctcttg gctca
15 <210> 17 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
528MM probe <400> 17 gtttctcatg gctca
15 <210> 18 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
529WA1 probe <400> 18 tctcttggct cagtt
15 <210> 19 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
529WA2 probe <400> 19 tctcttggcc cagtt

15 <210> 20 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
529WA3 probe <400> 20 tctcttggca cagtt
15 <210> 21 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
529WA4 probe <400> 21 tctcttggcg cagtt
15 <210> 22 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
529MT1 probe <400> 22 tctcttgact cagtt
15 <210> 23 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
529MT2 probe <400> 23 tctcttgacc cagtt
15 <210> 24 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
529MT3 probe <400> 24 tctcttgaca cagtt
15 <210> 25 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
529MT4 probe <400> 25 tctcttgccg cagtt
15 <210> 26 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
548WA1 probe <400> 26 tgtctggctt tcagt
15 <210> 27 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
548WA2 probe <400> 27 tgtctggcct tcagt
15 <210> 28 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
548WA3 probe <400> 28 tgtctggcat tcagt
15 <210> 29 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
548WA4 probe <400> 29 tgtctggcgt tcagt
15 <210> 30 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

548MV1 probe <400> 30 tgtctggttt tcagt
15 <210> 31 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
548MV2 probe <400> 31 tgtctggtct tcagt
15 <210> 32 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
548MV3 probe <400> 32 tgtctggtat tcagt
15 <210> 33 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
548MV4 probe <400> 33 tgtctggtgt tcagt
15 <210> 34 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
YMDD probe <400> 34 tcagttatat ggatgatg
18 <210> 35 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
YVDD probe <400> 35 tcagttatgt ggatgatg
18 <210> 36 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
YIDD1 probe <400> 36 cagttatata gatgatg
17 <210> 37 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
YIDD2 probe <400> 37 cagttatatac gatgatg
17 <210> 38 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
YIDD3 probe <400> 38 cagttatattt gatgatg
17 <210> 39 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
YSDD1 probe <400> 39 cagttatagt gatgatg
17 <210> 40 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
YSDD2 probe <400> 40 cagttatagc gatgatg

17 <210> 41 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
YSDD3 probe <400> 41 cagttattct gatgatg
17 <210> 42 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
YSDD4 probe <400> 42 cagttattcc gatgatg
17 <210> 43 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
YSDD5 probe <400> 43 cagttattca gatgatg
17 <210> 44 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
YSDD6 probe <400> 44 cagttattcg gatgatg
17 <210> 45 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
555WV probe <400> 45 gatgatgtgg tattggg
17 <210> 46 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
555MI1 probe <400> 46 gatgatattg tattggg
17 <210> 47 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
555MI2 probe <400> 47 gatgatatacg tattggg
17 <210> 48 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
528N-C probe <400> 48 gtttctcgtg gctca
15 <210> 49 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
528N-I-T probe <400> 49 gtttctctct ggctc
15 <210> 50 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
528N-I-A probe <400> 50 gtttctcact ggctc
15 <210> 51 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

528N-I-G probe <400>	51	gtttctcgct ggctc		
15 <210>	52 <211>	15 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
528N-I-C probe <400>	52	gtttctccct ggctc		
15 <210>	53 <211>	15 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
528N-D-1 probe <400>	53	gtttctctgg ctcag		
15 <210>	54 <211>	15 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
528N-D-2 probe <400>	54	cgttcttgg ctcag		
15 <210>	55 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
552N-C-C probe <400>	55	tcagttatct ggatgat		
17 <210>	56 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
552N-C-T probe <400>	56	tcagttattt ggatgat		
17 <210>	57 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
552N-I-A probe <400>	57	agttatatga gatgatg		
17 <210>	58 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
552N-I-C probe <400>	58	agttatatgc agatgat		
17 <210>	59 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
552N-I-G probe <400>	59	agttatatgg agatgat		
17 <210>	60 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
552N-I-T probe <400>	60	agttatatgt agatgat		
17 <210>	61 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
552N-I-AG probe <400>	61	gttatatgag agatgat		

17 <210>	62 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
552N-I-TC probe <400>				62 gttatatgtc agatgat
17 <210>	63 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
552N-D-1 probe <400>				63 tcagttattg gatgatg
17 <210>	64 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
552N-D-2 probe <400>				64 tcagttatgg atgatga
17 <210>	65 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
552N-D-3 probe <400>				65 tcagttatat gatgatg
17 <210>	66 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
552N-D-4 probe <400>				66 tcagttatat atgatga
17 <210>	67 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
552N-D-5 probe <400>				67 tcagttatag atgatga
17 <210>	68 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
555N-C-TC probe <400>				68 gatgatttcg tattggg
17 <210>	69 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
555N-C-CC probe <400>				69 gatgatctcg tattggg
17 <210>	70 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
555N-I-A probe <400>				70 gatgatgtag gtattgg
17 <210>	71 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
555N-I-T probe <400>				71 gatgatgttg gtattgg
17 <210>	72 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>

555N-I-G probe <400>	72	gatgatgtgg gtattgg		
17 <210>	73 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
555N-I-C probe <400>	73	gatgatgtcg gtattgg		
17 <210>	74 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
555N-I-AC probe <400>	74	atgatgtacg gtattgg		
17 <210>	75 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
555N-I-TC probe <400>	75	atgatgttcg gtattgg		
17 <210>	76 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
555N-I-GC probe <400>	76	atgatgtgcg gtattgg		
17 <210>	77 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
555N-I-AT probe <400>	77	atgatgtatg gtattgg		
17 <210>	78 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
555N-I-GG probe <400>	78	atgatgtggg gtattgg		
17 <210>	79 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
555N-D-1 probe <400>	79	agatgatggg tattggg		
17 <210>	80 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
555N-D-2 probe <400>	80	agatgatgtg tattggg		
17 <210>	81 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
555N-D-3 probe <400>	81	agatgattgg tattggg		
17 <210>	82 <211>	17 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
555N-D-4 probe <400>	82	agatgatggt attgggg		

1020030054204

출력 일자: 2004/8/5

17 <210> 83 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

555N-D-5 probe <400> 83 gagatgatgt attgggg

17